

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 419—420, September 1971

## Dünnschichtchromatographische Untersuchung von Phenolrot

Von B. MAROWSKI und W. FABRICIUS

*Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 28. August 1970/15. Juni 1971)

Der zur Nierendiagnostik verwendete Farbstoff Phenolsulfonphthalein (Phenolrot) wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf seine Reinheit untersucht. Sowohl die kommerziellen Originallösungen als auch selbst angesetzte wäßrige Lösungen der Reinsubstanz ergaben bei der Dünnschichtchromatographie mehrere Fraktionen. Mögliche Konsequenzen, die bei der Verwendung von in ihrer Einheitlichkeit nicht streng definierbaren Phenolrotlösungen in der Nierenfunktionsdiagnostik bedacht werden sollten, werden diskutiert.

### *Thin layer chromatographic study of phenol red*

The purity of phenolsulphonphthalein (phenol red), which is used in kidney diagnosis, was investigated by thin layer chromatography. Both the commercial solutions and the aqueous solutions of the pure substance prepared in the laboratory showed several fractions in thin layer chromatography. The possible consequences are discussed of using phenol red solutions whose purity cannot be strictly defined in the diagnosis of kidney function.

Obwohl das Phenolrot seit nahezu 60 Jahren in der Nierendiagnostik Anwendung findet (1—3), konnte bisher die Frage, ob sich der Farbstoff metabolisch inert verhält, nicht geklärt werden. Bei Bilanzversuchen war immer wieder aufgefallen, daß etwa 20% einer intravenös injizierten Dosis von 6 mg Phenolrot nicht mehr sicher auffindbar waren (5). Dieser Verlust wird auch nicht durch den geringen Prozentsatz Phenolrot erklärt, der beim Menschen in die Galle ausgeschieden wird, und der nach McLEOD und Mitarbeitern (5) ungefähr 3% einer intravenös injizierten Dosis von 5 mg entspricht.

Bei der Frage nach dem metabolischen Verhalten von Phenolrot und dem Verbleib des bislang nicht auffindbaren Farbstoffanteils von 20% muß zuerst die Einheitlichkeit handelsüblichen Phenolrots überprüft werden.

Wir berichten deshalb über die Ergebnisse dünnschichtchromatographischer Untersuchungen von Phenolsulfonphthaleinlösung der Fa. Merck, Darmstadt (Konzentration 0,6 und 6,0 g/l) und der Fa. Difco., Detroit.

### Material und Methoden

Mit Hilfe eines Desaga-Streichgerätes wird auf mit Aceton gereinigte, fettfreie Glasplatten vom Format 20 · 20 cm eine etwa 0,25 mm dünne Kieselgelschicht (Kieselgel nach Stahl der Fa. Merck, Darmstadt, mit einer mittleren Korngröße von 10—40 µm) aufgetragen.

Insgesamt werden 6 Proben auf der Startlinie des Chromatogramms, 20 mm vom Plattenrand entfernt und mit einem seitlichen Abstand von etwa 20 mm mit Hilfe einer Mikroliter-spritze auf einer Platte aufgetragen.

Es wurden die folgenden Proben untersucht:

1. Phenolsulfonphthalein der Fa. E. Merck, Darmstadt, in einer Konzentration von 6,0 g/l. Chargen Nr. J 2202606. Aufgetragen wurden 3 µl der Originallösung.

2. Phenolsulfonphthaleinlösung zur Nierenfunktionsprüfung der Fa. E. Merck, Darmstadt. Die Originallösung enthält laut Pro-

spekt 600 mg Farbstoff im Liter. Sie wurde im Rotationsverdampfer bei 40° auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingengt. Von dieser Lösung wurden ebenfalls 3 µl zur Trennung auf die Platten aufgetragen.

3. Phenolsulfonphthalein als Trockensubstanz der Fa. E. Merck, Darmstadt. Reagenzien Nr. 6163440. 300 mg Trockensubstanz wurden mit etwa 30 ml dest. Wasser aufgeschwemmt und zur Lösung mit 1N NaOH auf pH 7,1 titriert. Mit dest. Wasser wurde auf 50 ml aufgefüllt, so daß die Farbstoffkonzentration 6 g/l betrug. Aufgetragen wurden Probenvolumina von 3 µl.

4. Zur Orientierung wurde in gleicher Weise Phenolsulfonphthalein der Fa. Difco Lab., Detroit, Mich., USA, Control No. 510210 als Trockensubstanz untersucht. Es wurde, wie für das Präparat von Merck angegeben, in Lösung gebracht und in Probenvolumina von 3 µl auf die Platten gebracht.

Das Entwickeln des Chromatogramms erfolgte aufsteigend bei Raumtemperatur mit Butanol p. a.: Äthanol absolut. p. a.: 5proz. (v/v) Ammoniak = 4:1:1 (v/v).

Jede Mischung wurde nur für einen Lauf verwendet. Die Trennkammer wurde zur Kammersättigung mit Fließpapier, das mit Fließmittel getränkt war, ausgeschlagen. Die Fließmittelhöhe im Trenngefäß betrug etwa 1,3 cm. Die Trennstrecke war in allen Versuchen 15 cm lang und wurde von der Fließmittelfront in etwa drei Stunden zurückgelegt.

Es wurden mit jeder Lösung jeweils drei Dünnschichtplatten (a, b und c) mit 6 Auftragsstellen beschickt, so daß zur Auswertung 18 Bahnen der gleichen Lösung zur Verfügung standen.

Die  $R_F$ -Werte der bei Tageslicht sichtbaren und der bei Anregung mit UV-Licht fluoreszierenden Fraktionen wurden bestimmt und jeweils für die sechs Proben einer Platte und für die zusammengehörenden drei Platten einer Serie gemittelt. Die Intensität der Flecken konnte durch Ansprühen mit 5proz. Ammoniaklösung teilweise verstärkt werden.

### Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Trennungen der vier untersuchten Phenolrotlösungen aufgezeichnet.

Mit dem angewandten Trennverfahren waren mindestens fünf und maximal sieben verschiedene Fraktionen des Farbstoffs sicher nachweisbar.

Tab. 1  
Übersicht über die dünnschichtchromatographischen Trennergebnisse.  
 $\bar{x}_1$ : gemittelte  $R_F$ -Werte der Platten a—c  
 $\bar{x}_2$ : gemittelte  $\bar{x}_1$ -Werte

Testsubstanz	Anzahl der Flecken	$R_F$ -Werte			$\bar{x}_2$ (n = 18)	Fleckenform	Farbe (Tageslicht)	Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Exclt}} = 366 \text{ nm}$ )
		$\bar{x}_1$ (n = 6)	$\bar{x}_1$ (n = 6)	$\bar{x}_1$ (n = 6)				
Phenolrot der Fa. Merck 6,0 g/l Chargen Nr. J2202606	7	a.	b.	c.				
		0,14	0,15	0,12	0,14	halbmöndförmig	rot	—
		0,16	0,16	0,15	0,16	halbmöndförmig	—	mattgelb
		0,18	0,18	0,17	0,18	halbmöndförmig	rot	—
		0,42	0,41	0,40	0,41	längsoval	—	türkisblau
		0,43	0,43	0,42	0,43	queroval	gelb	—
		0,52	0,52	0,52	0,52	rund	—	mattgelb
Phenolrot der Fa. Merck 0,6 g/l „zur Nierenfunktions- prüfung“ Originallösung auf 1/10 des Volumens eingeeengt	6	0,61	0,61	0,60	0,61	rund	—	gräulich-weiß
		0,09	0,09	0,12	0,10	halbmöndförmig	braun-rot	—
		0,19	0,18	0,20	0,19	halbmöndförmig	rot	—
		0,35	0,30	0,37	0,34	rund	—	bläulich-weiß
		0,36	0,32	0,40	0,36	queroval	gelborange	—
		0,50	0,45	0,52	0,49	längsoval	—	mattgelb
		0,61	0,58	0,62	0,60	längsoval	—	gräulich-weiß
Phenolrot der Fa. Merck 6,0 g/l Reagenzien Nr. 6163440 Ansatz siehe Text	6	0,16	0,14	0,15	0,15	halbmöndförmig	—	hellgelb
		0,22	0,22	0,22	0,22	halbmöndförmig	rot	—
		0,40	0,41	0,41	0,41	rund	gelb	—
		0,51	0,50	0,50	0,50	rund	—	mattgelb
		0,55	0,54	0,54	0,54	rund	gelb	—
		0,61	0,60	0,60	0,60	rund	—	weißgelb
		0,17	0,18	0,17	0,17	halbmöndförmig	—	weiß
Phenolrot der Fa. Difco 6,0 g/l control No. 510210 Ansatz siehe Text	5	0,21	0,23	0,22	0,22	rund-rechteckig	rot	—
		0,43	0,46	0,44	0,44	rund	—	grau-bläulich
		0,55	0,58	0,58	0,57	rund	—	mattgelb
		0,60	0,62	0,62	0,61	rund	—	mattgelb

Auffällig war die unterschiedliche Fleckenzahl bei den beiden geprüften Farbstofforiginalösungen der Fa. E. Merck, Darmstadt. So wies die konzentrierte Phenolrotlösung (Untersuchungsmaterial Nr. 1) gegenüber der weniger konzentrierten (Untersuchungsmaterial Nr. 2) eine zusätzliche Fraktion auf. Die Flecken mit den  $R_F$ -Werten 0,18–0,22 waren am farbintensivsten nach Besprühen mit Ammoniaklösung.

### Diskussion

Die dünnschichtchromatographischen Trennungen ergaben, daß keine der untersuchten Phenolrotlösungen als einheitliche Lösung zu bezeichnen ist. Die unterschiedliche Fleckenzahl bei den Farbstofflösungen weist auf den wechselnden Charakter der Verunreinigungen hin. Aufgrund dieser qualitativen Angaben über die Reinheit des Farbstoffs sollten beim Durchführen des Phenolrottestes in der klinischen Routinediagnostik folgende Bedenken Berücksichtigung finden:

1. Beigemischte Fremdprodukte mit unbekannter Ausscheidungskinetik könnten für das Phenolrotdefizit in Bilanzversuchen verantwortlich sein.

2. Es bestehen toxikologische Bedenken gegen die Applikation einer nicht streng definierten Substanz beim Menschen. Phenolrot galt bisher als nicht toxisch und gut verträglich. Wie durch ein Rundschreiben der Firma E. Merck, Darmstadt, vom 7. 6. 1971 bekannt wurde, sind jedoch allergische und anaphylaktische Reaktionen nach Phenolrotapplikation möglich. Es wird in diesem Schreiben auch von einem Todesfall berichtet (6).

3. Wenn, wie es manche Autoren empfehlen (4), sehr große Mengen des Farbstoffs injiziert werden, die die bisher üblichen Dosen von 6 mg Phenolrot pro Test bis um das 100fache überschreiten, sollte die Toxizität des Phenolrots und seiner Verunreinigungen erneut überprüft werden.

Für die Phenolrotbestimmung im Serum haben wir eine verbesserte Methode angegeben (7).

Normalwerte für diese Methode können jedoch erst dann ermittelt werden, wenn ein Farbstoff zur Verfügung steht, der sich auch bei dünnschichtchromatographischer Untersuchung als einheitlich erweist.

Wir danken Frau LOTH und Frau BEINHAEUER für ihre sorgfältige Mitarbeit.

### Literatur

1. ROWNTREE, L. G. und J. T. GERAGHTY, J. Pharmacol. exper. Therap., Baltimore 1, 579 (1910). — 2. OFFERMANN, G., Der intravenöse Phenolrottest. Inauguraldissertation, Freie Universität Berlin (1968). — 3. HÖFFLER, D., G. OFFERMANN und H. FRENZ, Dtsch. med. Wschr. 93, 397 (1968). — 4. SCHWARTZKOPFF, W., Z. exper. Med. 150, 120 (1969). — 5. McLEOD, G. M., A. B. FRENCH, C. J. GOOD und F. S. WRIGHT, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 71, 192 (1968). — 6. Rundschreiben der Fa. E. Merck, 61 Darmstadt, Postfach 4119, Frankfurter Straße 250, vom 7. 6. 1971, gez. von Dr. Bayer und Dr. Iltgen. Betr.: Todesfall nach Injektion von Phenolsulfonphthalein. — 7. FABRICIUS, W. und B. MAROWSKI, diese Z. 8, 431 (1970).

Dr. Bernhard Marowski  
1 Berlin 12  
Windscheidstr. 12

Dr. Wolfgang Fabricius  
Siemens Aktiengesellschaft, Vertrieb Datentechnik  
1 Berlin 61, Schöneberger Str. 2—4